

Untersuchungen zur Stabilität
der Latex- γ -Globulin-Bindung (der Suspension
von mit γ -Globulin beladener Latex-Partikel)
bei der Dissoziation des
Rheumafaktor- γ -Globulin-Komplexes

von

ELISABETH BATSTONE, geb. Hörhager

München 1965

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Untersuchungen zur Stabilität der Latex- γ -Globulin-Bindung
(der Suspension von mit γ -Globulin beladener Latex-Partikel)
bei der Dissoziation des Rheumafaktor- γ -Globulin-Komplexes

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Elisabeth Batstone, geb. Hörhager

aus

Nürnberg

München

1 9 6 5



Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Referent: Privatdozent Dr. H. Mathies

Coreferent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. R. Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.1965

Inhaltsverzeichnis:

Seite:

Einleitung	1
Eigene Untersuchungen	20
Material	20
Methodiken	21
Versuchsreihen	22
Diskussion	29
Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	33

Einleitung

=====

1922 beobachtete M e y e r ⁶⁴ als erster eine hämagglutinationsfördernde Wirkung mancher Seren bei Ausführung der Wassermann' Reaktion. Die Agglutination erfolgt nur mit sensibilisierten Hammelblutkörperchen und der agglutinationsfördernde Faktor behält bei Erwärmung auf 56°C (30 min) seine volle Aktivität, durch Erhitzen auf 70°C (30 min) wird er aber inaktiv. Eine Verbindung zur chronischen Polyarthrits wurde noch nicht gesehen. Zwar beobachteten C e c i l , N i c h o l l s und S t a i n s b y ¹³ bereits 1931 die Fähigkeit der Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis bestimmte Streptokokkenarten zu agglutinieren, was aber damals für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen Streptokokken mißdeutet wurde.

1940 machte W a a l e r ¹¹¹ auf den Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Faktors im menschlichen Serum, der die spezifische Agglutination der Hammelblutkörperchen fördert, und der klinischen Diagnose der chronischen Polyarthrits aufmerksam. Der "agglutination activating factor" ist hitzestabil bei 60°C (30 min) und reagiert nur mit sensibilisierten Hammelblutkörperchen. R o s e und Mitarbeiter ⁸⁷ zeigten, daß Rheumatikerseren auch normale, nicht sensibilisierte Hammelblutkörperchen bis zu einer gewissen Verdünnung agglutinieren können und entwickelten 1948 den Differentialagglutinations-Test, der als "Waalser-Rose-Test" zur Basis der serologischen Diagnostik der rheumatoiden Arthritis wurde. Dieses Verfahren wurde von H e l l e r und Mitarbeitern ⁴⁴ und von S v a r t z und S c h l o s s m a n n ⁹⁹ modifiziert und wird heute als "Heller-Svartz-Schlossmann-Test" noch angewandt. Die Hammelblutkörperchen können auch durch heterophile Antikörper des untersuchten Serums agglutiniert werden, deshalb muß das Patientenserum erst mit normalen gewaschenen Hammelblutkörperchen absorbiert werden ⁴⁴. Die Agglutination zeigt dann die Reaktion des Rheumafaktors mit dem

Ambozeptor, d.h. mit Kaninchen- γ -Globulin.

Anstelle von Hammelblutkörperchen können auch Blutkörperchen anderer Tierarten ^{46,86,82,112} und Erythrozyten der Blutgruppe A und O rh-, die mit den entsprechenden Antiseren von Kaninchen sensibilisiert sind, treten. Oder auch menschliche O Rh+ Blutkörperchen, die mit inkompletten, also nicht agglutinierenden Anti-Rh-Antikörpern im Laboratoriumsversuch sensibilisiert werden, können durch Rheumafaktor agglutiniert werden ^{34,113}.

S v a r t z und S c h l o s s m a n n ^{100,101,103,104} versuchten, durch CO₂-Fraktionierung und durch Kältepräzipitation zu einer Einengung des reaktiven Materials zu kommen.

Z i f f und Mitarbeiter ¹¹⁸ zeigten durch ein Dialyseverfahren gegen Phosphat-Citrat-Puffer, daß der Rheumafaktor in der Euglobulin-Fraktion konzentriert werden kann.

1954 erkannten H e l l e r und Mitarbeiter ⁴⁵, daß statt an sensibilisierte Hammelblutkörperchen auch an tanninbehandelte Hammelblutkörperchen menschliches Gamma-Globulin der Cohn-Fraktion II angelagert wird und dann mit Rheumafaktor reagiert, und führten somit den sogenannten F II-Test ein. Latex- ⁹² (Polystyren-Kunststoff) und Bentonit- ¹⁰ (natürliches kolloidales Aluminiumsilikat) Partikelchen wiesen ein gutes unspezifisches Bindungsvermögen für Serum-Eiweißkörper auf, wenn sie mit menschlichem Gamma-Globulin beladen sind. Auf diesen Erkenntnissen beruht der Latex-Fixations-Test von S i n g e r und P l o t z ⁹² und der sehr einfach durchzuführende Latex-Tropfen-Test ⁷², wie auch der Objektträger-Agglutinations-Test, ein Vorläufer der heutigen Latex-Tropfen-Test-Methode ⁹³.

Alle diese Testmethoden wiesen darauf hin, daß die Erythrozyten und die Kunststoff-Partikelchen in den Hämagglutinations-Systemen an der eigentlichen Reaktion nicht direkt beteiligt sind, sondern lediglich

zur Sichtbarmachung der Reaktion dienen. Darauf wies die Entdeckung von E p s t e i n und Mitarbeitern ²², daß der Rheumafaktor auch mit Gamma-Globulin der Cohn-Fraktion II reagieren kann, wenn es nicht an eine Trägersubstanz gebunden ist. Durch Erhitzen für 5-30 Minuten auf 63-65°C oder Behandlung mit Harnstoff, Methylmerktan, Alkali oder Säuren ^{20,28,8,48,71} bildet das Gamma-Globulin Aggregate, die besser mit dem Rheumafaktor reagieren können. Auf diesen Erkenntnissen beruhten die F II-Präzipitin-Reaktion von E p s t e i n ²² und die sogenannte Grenzschicht-Reaktion von K l e i n e und Mitarbeitern ⁴⁸, bzw. M ü l l e r und H a f t s t e i n ⁷¹.

Auch verschiedene Bakterienarten, wie C e c i l l , N i c h o l l s und S t a i n s b y ¹³ schon früher erkannt hatten, werden durch Rheumaseren agglutiniert ^{16,81,80,116}. Auch dies wird mit der Fähigkeit des Rheumafaktors zur Bindung anderer körpereigener Gamma-Globulin-Moleküle erklärt. Normal-Antikörper (γ -Globuline) werden an Bakterien angelagert, an die anschließend der Rheumafaktor gebunden wird, was zur Bakterienagglutination führt ^{112,54}. Allen diesen Reaktionen liegt die Bindungsfähigkeit des Rheumafaktors an γ -Globulin zugrunde, die eine Präzipitation oder - bei Anlagerung an die Trägersubstanz - eine Agglutination verursacht.

W a a l e r ¹¹¹ hat mittels einer Ammoniumchloratfällung den "agglutination activating factor" in die Globulinfraction lokalisiert, während noch M e y e r ⁶⁴ ein Vorkommen sowohl in der Globulin- als auch in der Albumin-Fraktion annahm. Die Elektrophorese des Serums von chronischen Polyarthritikern, von R o s e und Mitarbeitern ⁸⁷ durchgeführt, wies den agglutinierenden Faktor in der β - γ -Globulinfraction nach. H e l l e r und Mitarbeiter ⁴⁶ modifizierten die Cohn-Fraktionierung gering und stellten damit die agglutinierende Aktivität in der Fraktion III, die vorwiegend β -Globuline, aber auch α - und γ -Globuline enthält, fest, während Fraktion II, VI₁ und V agglutinationsinaktiv war, somit eine Lokalisation in der Albumin-, α - und γ -Globulin-Fraktion fraglich erschien. Ein kontinuierliches Elektrophoreseverfahren, z.B. von M ü l l e r ⁷⁰ und A n t o n a c i

und Mitarbeitern ³ konnte eine starke Anreicherung im β - γ -Globulinbereich nach R o s e und Mitarbeitern ⁸⁷ bestätigen. S v a r t z und S c h l o s s m a n n ¹⁰⁴ lokalisierten bei der zonenelektrophoretischen Auftrennung des Kältepräzipitats die Agglutinationsaktivität in den γ -Globulinbereich.

Die γ -Globulin-Fraktion ist komplex und so mußte untersucht werden, welcher Unterfraktion der Rheumafaktor angehört. Mit der Papierelektrophorese und mit der freien Elektrophorese ist eine weitere Auftrennung nicht möglich. Immunelektrophoretische Untersuchungen lieferten Anhaltspunkte, daß der Rheumafaktor im β_{2M} -Globulinbereich lokalisiert ist. S c h e i d e g g e r ⁸⁸ entdeckte die β_{2M} -Globuline, die nach B u r t i n ³³ aus einer Vielzahl verschiedener Proteine mit gleicher Antigenspezifität bestehen. Das β_2 -Makro-Globulin enthält nach F r a n k l i n und Mitarbeitern ²⁸ Isoagglutinine, Wassermann-Antikörper, die kompletten Rh-Agglutinine und einige pathologische Hämagglutinine.

Zusammen mit den γ -Globulinen bilden die β_2 -Globuline die Immunglobuline ³². F r a n c q und Mitarbeiter ²⁵ sowie M ü l l e r ⁷⁰ zeigten eine gute Übereinstimmung zwischen immunelektrophoretischer β_{2M} -Globulin-Vermehrung und Positivität in den Agglutinationstesten, jedoch keine Abhängigkeit der Vermehrung vom Agglutinationsgrad bzw. -titer. F r a n c q und Mitarbeiter ²⁵ untersuchten ein Harnstoff-Eluat eines Rheumafaktor- γ -Globulin-Komplexes immunelektrophoretisch und konnten damit den Rheumafaktor als β_2 -Makro-Globulin identifizieren. Gegen ein Anti- β_{2M} -Globulin-Serum ergaben Normalseren, rheumafaktorpositive Seren, sowie mit verschiedenen Methoden eingeeengter Rheumafaktor keine Antigenspezifität ^{51,5}. Alle Nachweismethoden des Rheumafaktors beruhen auf der Fähigkeit des Rheumafaktors, Gamma-Globulin zu binden. Aber nicht alle menschlichen Gamma-Globulin-Präparationen ohne Trägersubstanz können mit dem Rheumafaktor reagieren. F r a n k l i n und Mitarbeiter ²⁸ machten die

Beobachtung, daß elektrophoretisch gewonnenes Gamma-Globulin aus menschlichem Normalserum nicht präzipitiert. Wird es aber so verändert, daß sich Gamma-Globulin-Aggregate bilden, so reagiert es deutlich mit dem Rheumafaktor. 5-15 Minuten langes Erhitzen auf 63-65°C oder eine Behandlung mit Harnstoff, Methylmerkaptan, Alkali oder Säure bewirken diese Aggregation^{20,28}. Nach E d e l m a n n und Mitarbeitern²⁰ erweist sich das Verfahren mit Harnstoff zusammen mit Methylmerkaptan günstiger als das Erhitzen für 10 Minuten auf 63°C. Auch Guanidin kann verwendet werden, während Jodacetamid die Bildung von Aggregaten verhindert. Wahrscheinlich blockiert es die S-S Brückenbildung. C h r i s t i a n¹⁵ weist auf eine schwere Komponente von S 30-40-Globulinen hin. Durch Natriumsulfat-Fällung der Cohn-Fraktion II gewann er Unterfraktionen, in denen er mit der Ultrazentrifuge eine S 30-40-Globulin-Komponente nachwies, die in elektrophoretisch isoliertem Gamma-Globulin erst nach Erhitzen für 10 Minuten auf 63°C erscheint. Erhitzt man Cohn-Fraktion II, so nimmt die S 30-40-Globulin-Komponente zu. Die Unterfraktion, die bei Fraktionierung der Cohn-Fraktion II keine schwere Komponente enthielt, zeigt sie nach Erhitzen ebenfalls. Das Entscheidende dabei ist, daß sich der Hexose-Nitrogen-Quotient dieser S. 30-40-Globuline nicht von dem der 7 S-Globuline unterscheidet, im Gegensatz zum normalen 19 S-Globulin, das einen höheren Kohlehydratgehalt hat⁷⁶. Danach bestehen diese schweren Komponenten aus leichten 7 S-Globulinen, die sich durch das Erwärmen zu Makromolekülen aggregiert haben.

Dies bewiesen auch die immunoelektrophoretischen Untersuchungen von D e i c h e r und B e h r e n d¹⁷, die γ -Globuline, dagegen keine β_{2A} - oder β_{2M} -Globuline fanden. Die Globulin-Präparationen reagieren im Präzipitintest nach E p s t e i n²² entsprechend ihrem Gehalt an S 30-40-Komponenten, die durch den Stickstoffgehalt des Präzipitats im Vergleich zum Stickstoffgehalt des entsprechend zugegebenen Proteins bestimmt werden. Es ergibt sich dabei, daß Cohn-Fraktion II eine schwache Präzipitation, ihre Natriumsulfat-Unterfraktion mit

größerem Gehalt an S 30-40-Komplexen und erhitze Cohn-Fraktion II eine deutliche, die Natriumsulfat-Fraktion der erhitzten Cohn-Fraktion II die stärkste Präzipitation zeigt. Lagegen präzipitierte elektrophoretisch gewonnenes Gamma-Globulin nicht mit dem Rheumafaktor, obwohl M ü l l e r ⁷⁰ in seiner Grenzschichtreaktion native Gamma-Globulin-Lösung verwendet, was aber nicht ausschließt, daß in ihr alterierte Gamma-Globuline enthalten sind. Wegen besserer Reaktionsfähigkeit hat M ü l l e r ⁷⁰ auch später die Gamma-Globulin-Lösung 30 Minuten auf 63°C erhitzt.

Die Untersuchungen von F r a n k l i n und Mitarbeitern ²⁸ und von C h r i s t i a n ¹⁵ ergaben, daß der Reaktant aggregiertes Gamma-Globulin sein muß. Durch den Präparationsvorgang müssen anscheinend in der Cohn-Fraktion II bereits Aggregate vorhanden sein, die durch Erhitzen noch vermehrt werden. Durch diese Aggregation kommt es vermutlich zu Molekularveränderungen, die auch bei der Bindung der Antikörper- γ -Globuline an ein Antigen auftreten. Die entsprechenden Versuche führte C h r i s t i a n nach dem F II-Test nach H e l l e r und Mitarbeitern (s.o.) mit tannierten Erythrozyten durch.

Bei der Verwendung von Latex-Partikelchen als Trägersubstanz wird von B e r n h a r d und Mitarbeitern ⁸ angenommen, daß die Beladung der Latex-Teilchen bereits eine Aggregatbildung der Gamma-Globuline bewirkt. Sie verwendeten bei dem Latex-Fixations-Test, der auf der Messung der optischen Dichte des Überstandes der zentrifugierten Agglutinate beruht, natives elektrophoretisch gewonnenes Human- γ -Globulin.

D e i c h e r und B e h r e n d ¹⁷ bestätigten diese Ergebnisse und kamen zu dem überraschenden Resultat, daß vorher aggregatfreie Cohn-Fraktion II durch Erhitzen auf 63°C für 10 Minuten trotz Aggregatbildung für den Latex-Fixations-Test weniger brauchbar wurde. Nach B e r n h a r d und Mitarbeitern ⁸ verbessert dagegen

das Erhitzen der Cohn-Fraktion II, die vorher nicht von Aggregaten befreit wurde, deren Fähigkeit als Reaktant; gleichzeitig geht auch die Spontanagglutination zurück.

Die Autoren schließen sich der Meinung von C h r i s t i a n ¹⁵ an, daß durch den Präparationsvorgang bei der Cohn-Fraktionierung das γ -Globulin bereits als Teilaggregat vorliegt, da die Cohn-Fraktion II auch unerhitzt Komplement binden kann. E d e l m a n n und Mitarbeiter ²⁰ sowie V a u g h a n ¹⁰⁷ zeigten, daß der Rheumafaktor auch an Präzipitate aus einem löslichen Antigen und seinem entsprechenden Antikörper, z.B. Eieralbumin und dagegen gerichtete Antikörper vom Kaninchen, gebunden und isoliert werden kann. Die Sedimentationskonstante dieses Antigen-Antikörper-Komplexes muß dabei mindestens 20 S betragen, um mit dem Rheumafaktor reagieren zu können. Der Rheumafaktor, der sich in Seren von Patienten mit primär chronischer Polyarthritits nachweisen läßt, ist kein genau definierbares Protein, sondern weist eine Heterogenität auf.

Aber auch in Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen und auch von Gesunden finden sich Faktoren, die mit γ -Globulin zu reagieren vermögen. K u n k e l ⁵⁰ schlug vor, alle diese Faktoren entsprechend ihrer gemeinsamen Eigenschaft mit γ -Globulin zu reagieren, als Anti-Gamma-Globulin-Faktoren zusammenzufassen.

Für eine Heterogenität des Rheumafaktors spricht ein unterschiedliches Verhalten gegenüber menschlichen und tierischen Seren. Manche Seren von Patienten mit primär chronischer Polyarthritits reagierten nur mit Kaninchenambozeptor, andere ausschließlich mit menschlichem γ -Globulin. Wahrscheinlich steht diesen Befunden in den meisten Fällen eine gleichzeitige Kreuzreaktion mit γ -Globulin am Menschen und von Kaninchen gegenüber. Man hat deshalb auch einen "Waalser-Rose-Faktor" und einen "Latex-Faktor" unterschieden ¹⁴. Es fanden sich Faktoren mit ausschließlicher Spezifität für menschliche oder tierische γ -Globuline, aber auch Faktoren, die mit γ -Globulinen mehrerer Spezies reagieren ^{58,43,27,26}.

In seinen Versuchen weist Seifert⁹⁰ einen hämagglutinierenden Faktor, einen Streptokokken agglutinierenden Faktor und zwei Latex agglutinierende Faktoren, einen im CO₂-Präzipitat und einen im Überstand, nach.

Grubb^{37,34,35,36} und Grubb und Laurell³⁸ und Harboe⁴⁰ und Lundevall⁴¹ zeigen, daß "gruppenspezifische" Rheumafaktoren existieren, die eine genetisch bedingte Determination aufweisen.

Bei Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge ließen sich Rheumafaktoren mit unterschiedlicher Sedimentationskonstante nachweisen, 19 S- und 7 S-Rheumafaktor und deren aktive Komplexe von 22 S und 10-15 S^{50,53} (s. später). Der Nachweis einer Rheumafaktor-Aktivität im Serum ist für die primär chronische Polyarthrititis nicht spezifisch. Besonders oft fanden sich bei den Kollagenkrankheiten, zu denen Lupus erythematodes^{59,19,70,116}, die Periarteriitis nodosa⁷⁰, die Sklerodermie^{116,70} und die Dermatomyositis^{116,70} gehören, Anti-Gamma-Globulin-Faktoren, jedoch nicht annähernd so häufig, wie bei der chronischen Polyarthrititis.

Zur Differential-Diagnose der chronischen Polyarthrititis gegenüber der akuten Polyarthrititis, dem M.Reiter, der Harnsäuregicht und Arthrosen, bei denen der Rheumafaktor nur selten gefunden wird, ist der Rheumafaktornachweis dagegen klinisch ganz bedeutsam.

Miehle⁶⁶ und Mitarbeiter unterscheiden beim M.Bechterew eine sogenannte skandinavische Form mit peripherer Gelenkbeteiligung, die häufiger eine positive Agglutination zeigt. Müller und Schupp⁷² können diese Meinung nicht bestätigen. Auch bei der Arthritis psoriatica fanden Dresner und Trombly¹⁹ häufig positive Ausfälle im Gegensatz zu Müller-Eberhard⁷⁴. Bei der Silikose tritt öfter eine positive Reaktion auf^{66,67,18}, beachtenswert häufig beim Caplan-Syndrom⁶⁸.

Auch bei Erkrankungen außerhalb des rheumatischen Formenkreises, wie bei der Hepatitis und der Leberzirrhose, findet sich häufiger als bei Gesunden eine positive Agglutinationsreaktion ^{70,19,61}, sowie auch bei Sepsis lenta, unspezifischer und tuberkulöser Lungenerkrankung, Syphilis und M.Boeck (zit. 70). ^{Dresner und Trombly}¹⁹ untersuchten noch einige Fälle von Virusinfektionen (Herpes zoster, infektiöse Mononukleose und Viruspneumonie) und wiesen auf ein Anti-Gamma-Globulin hin, wie es sich auch bei der Makroglobulinämie Waldenström findet.

Diese Anti-Gamma-Globulin-Faktoren, die bei M.Boeck, bei Syphilis, bei Hepatitis und Leberzirrhose nachgewiesen sind, ergeben viel seltener als der eigentliche Rheumafaktor Kreuzreaktionen mit Kaninchen- γ -Globulin, sie sind z.B. im Waaler-Rose-Test viel seltener positiv als im F II-Test oder Latex-Test ^{47,73,83}. Man schließt so auf immunologische Unterschiede gegenüber dem Rheumafaktor, während die Sedimentationskonstante der des Rheumafaktors entspricht ^{47,73,58,19}. Dagegen findet sich bei der Makroglobulinämie Waldenström ein Globulin mit einer Sedimentationskonstanten von 15-32 S ¹⁹.

Durch die Kältepräzipitation des Serums wurde versucht, den Rheumafaktor von den anderen agglutinierenden Faktoren zu trennen ^{95,102,104,42,9}. Dies wurde jedoch durch Untersuchungen von ^{Miche li} und Mitarbeitern ⁶⁵ und anderen Autoren ^{47,108,24,114} widerlegt.

Aber auch in Seren Gesunder konnte in sehr geringem Prozentsatz ein Anti-Gamma-Globulin-Faktor nachgewiesen werden ^{59,70}. Mit dem Latex-Tropfen-Test wurde von ^{Mathies}⁶⁰ ein Prozentsatz von ungefähr 2 % gefunden.

Es wird angenommen, daß hereditäre Faktoren beim Auftreten der Anti-Gamma-Globuline beteiligt sind, da sie gehäuft in Familien von Patienten mit chronischer Polyarthrit is auftreten ^{6,4,49,57,89,119}.

M ü l l e r - E b e r h a r d ⁹⁹ und T a r a n t a und Mitarbeiter ¹⁰⁵ wiesen im Serum von Gesunden einen hitzelabilen Faktor nach, der Gamma-Globulin-Aggregate präzipitiert und sich vom Komplement in mehreren Eigenschaften unterscheidet.

Obwohl vieles für die Antikörpernatur des Rheumafaktors spricht, ist sie jedoch nicht bewiesen. Da das 19 S- γ -Globulin bekannt dafür ist, eine Anzahl von Antikörpern zu enthalten (Franklin und Kunkel, 1957) scheint es möglich, daß der 19 S-Rheumafaktor ein Antikörper ist ²⁹. K u n k e l ⁵⁰ setzt sich eindeutig in seinen letzten Arbeiten für die Antikörpernatur des Rheumafaktors ein. Der Rheumafaktor ist ein β_{2M} -Globulin, wie verschiedene Antikörper, und hinsichtlich seines Sedimentationskoeffizienten und seiner Wanderungsgeschwindigkeit im Gelmedium verhält er sich wie ein Antikörper. Auch die Heterogenität spricht für die Antikörpernatur ^{86,11,50}. Über das auslösende Antigen gibt es heute nur Vermutungen.

Durch Immunisierung von Tieren mit Bakterien ^{70,31,23,57,91,97} mit artfremden Eiweiß ¹⁰⁶ oder mit Antigen-Antikörperkomplexen ² konnte experimentell ein Anti-Gamma-Globulin induziert werden, das dem natürlich auftretenden Rheumafaktor in seiner Reaktionsweise gleicht. Bei diesen Versuchen wäre dann der Rheumafaktor ein Antikörper gegen einen Antigen-Antikörperkomplex.

Neuerdings diskutiert man auch eine Autoantikörpernatur des Rheumafaktors. K u n k e l und F u d e n b e r g ⁵² wiesen in ihren Untersuchungen eine Isospezifität und eine Autospezifität des Rheumafaktors gegenüber Gamma-Globulinen nach. M i l g r o m und W i t e b s k y ⁶⁹ immunisierten Kaninchen mit autologem γ -Globulin und wiesen einen Antikörper gegen γ -Globulin des Kaninchens und des Menschen nach.

Dabei sollen denaturierte autologe Gamma-Globuline die Bildung von Autoantikörpern stimulieren, die infolge übergreifender Spezifität auch mit nativem Fremd- γ -Globulin reagieren ⁶⁹. Nach V o r l a e n d e r ¹¹⁰

setzt eine Autoantikörperbildung eine Fremdwerdung oder Fremdepfindung körpereigener Substanzen voraus, die dann wie Antigen eine Antikörperbildung bewirken. Die erworbene Immuntoleranz gegen Eigenantigene wird von außen durchbrochen, z.B. durch Immunisierung mit verschiedenen Bakterien und Erzeugung eines Anti-Gamma-Globulin-Faktors.

N a j j a r und F i s c h e r ⁷⁸ und Mitarbeiter ⁷⁹ meinen, daß der Antigen-Antikörper-Komplex Strukturveränderungen des γ -Globulins (Antikörper) bewirken könnte und daraus eine Fremdepfindung resultiert. V o r l a e n d e r ¹¹⁰ stimmt dieser Erklärung jedoch nicht zu, denn es erklärt nicht die Fälle, für die die Autoantikörperbildung nicht Ursache der Erkrankung ist, sondern nur ein Symptom, wie es bei der chronischen Polyarthritits sein dürfte. Nach der Theorie von B u r n e t ¹² ist nicht allein das Antigen für die Prägung des Antikörpers ausschlaggebend. Die Struktur des Antikörpers ist durch das genetische Material der Zellen des Immunsystems und der aus ihr hervorgehenden Tochterzellen ("Klone") bestimmt, während dem Antigen allein die auslösende Wirkung für die Bildung des Antikörpers zukommt.

Pathologischer Immunverlust bedeutet nach B u r n e t der Fortbestand der Klone, die normalerweise nach Immuntoleranzentwicklung untergehen, infolge Mutation oder genetisch bedingter Abnormität bestimmter zur Antikörperbildung befähigter Zellen. Z i f f ¹¹⁷ ist der Ansicht, daß bei der chronischen Polyarthritits eine genetisch bedingte Abnormität der antikörperbildenden Zellen mit Verlust der Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen vorliegt. Gegen die Antikörpernatur des Rheumafaktors spricht folgender Einwand:

Üblicherweise wird ein Antikörper ganz durch das entsprechende Antigen absorbiert, während das beim Rheumafaktor in seiner Bindung an γ -Globulin anscheinend nicht zutrifft ¹¹¹. M ü l l e r ⁷⁰ entkräftigt diese Zweifel durch seine Versuchsergebnisse, die eine vollständige Absorption mit menschlichem γ -Globulin ermöglichte, dagegen soll eine vollständige Absorption an tierisches γ -Globulin nicht möglich sein.

Der Einwand von H e i m e r (zit. 50) gegen die Antikörpernatur des Rheumafaktors besteht darin, daß der Rheumafaktor kein Komplement binden kann. Gamma-Globulin beladene Latex-Partikelchen können, wenn sie nicht an Rheumafaktor gebunden sind, Komplement binden, was dafür spricht, daß Rheumafaktor und Komplement die gleiche Stelle am γ -Globulin einnehmen. Der Rheumafaktor verhält sich also wie der inaktive Teil eines Komplements.

Nach den Untersuchungen von V a u g h a n ¹⁰⁷ und E d e l m a n n und Mitarbeitern ²⁰ verhält sich der Rheumafaktor wie ein Komplement, da er an Immunpräzipitate und an lösliche Antigen-Antikörperkomplexe absorbiert wird. Ein stichhaltiger Einwand gegen die Komplementnatur ist die Feststellung von M ü l l e r ⁷⁰, daß der Rheumafaktor durch Erhitzen für eine Stunde bei 56°C nicht inaktiviert wird wie Komplement, sondern bis etwa 62°C bei 30minütigem Erhitzen noch aktiv bleibt.

Die Untersuchungen von E l l i s und F e l i x - D a v i e s ²¹ sowie L a u r e l l und G r u b b ⁵⁵ weisen darauf hin, daß kein Unterschied im Komplementtiter zwischen Normalserum und Polyarthritiss-erum, sowie insbesondere keine Parallelität zwischen Komplementtiter und Rheumafaktorgehalt bestehen soll. Dagegen haben P e r l i c k ⁸⁴ und G e i d e l und Mitarbeiter ³⁰ eine Erniedrigung des Komplementtiters bei chronischer Polyarthrititis festgestellt.

Eine Bindung des Komplements an Rheumafaktor oder die etwaige Komplementnatur des Rheumafaktors ist noch nicht hinreichend geklärt.

Durch verschiedenste Serum-Fraktionierungs-Methoden wurde versucht, eine Lokalisation des Rheumafaktors festzulegen. Die CO₂-Fraktionierung des Serums von M e y e r ⁶⁴ bereits im Jahre 1922 ergab, daß der "agglutinationsfördernde Faktor" sowohl im wieder gelösten Sediment als auch im Überstand gleich wirksam war. Erst 1953 wiederholten S v a r t z und S c h l o s s m a n n ^{100,102} dieses Verfah-

ren, leiteten CO_2 in eisgekühltes Serum und stellten mit dem Hämagglutinationstest fest, daß Präzipitat und Überstand agglutinationsaktiv waren. Durch diese Methode glaubten sie, eine größere Spezifität des Hämagglutinationstestes zu erreichen; sie gingen aber bald zur Kältepräzipitation^{104,103} über, die größere wissenschaftliche Bedeutung erreicht hat. Die kältepräzipitierenden Proteine, früher Kältefraktion⁹⁴ bzw. Cryoglobuline benannt, wurden elektrophoretisch von A b r a m s und Mitarbeitern¹ untersucht und vorwiegend als γ -Globuline und wenig als β -Globuline befunden. Die Immunelektrophoretische Untersuchung von M ü l l e r⁷⁰ ergab vorwiegend γ -Globuline, α_2 - und β_2 -Makro-Globuline. Aber auch bei der Kältefraktionierungs-Methode wiesen S v a r t z und S c h l o s s m a n n^{104,103} den agglutinierenden Faktor sowohl im Präzipitat wie im Überstand nach. Obwohl dieses Verfahren keine Lokalisation des Rheumafaktors im Eiweißspektrum ergab, soll damit nach S v a r t z und S c h l o s s m a n n¹⁰⁴ der Rheumafaktor bei chronischer Polyarthritits von den hämagglutinierenden Faktoren anderer Kollagenkrankheiten zu trennen sein, da sich letztere nur im Überstand finden sollen. Auch die Ausbeute an positiven Ergebnissen bei chronischer Polyarthritits soll höher sein.

Das Dialyseverfahren nach Z i f f und Mitarbeitern¹¹⁸, bei dem inaktiviertes Serum in Aqua dest. gelöst und gegen Citrat-Phosphat-Puffer dialysiert wird, ergab einen Rheumafaktor-Nachweis im Präzipitat (aufgefüllt mit Puffer-Kochsalzlösung pH 7,0) und dadurch eine wesentliche Verbesserung der Trefferquote. Es wird auf die inhibitorische Aktivität zurückgeführt, die sich bei chronischen Polyarthritikern nur im Überstand, bei Nichtrheumatikern auch im Präzipitat findet.

Die Fraktionierungs-Methoden, bei denen, vielleicht mit einigen Differenzen in der Zusammensetzung, eine Euglobulin-Fraktion erhalten wird, vermag über die Lokalisation des Rheumafaktors nicht viel auszusagen, dagegen haben sie als Ausgangsmaterial für weitere Auftrennungen einige Bedeutung.

Die Salzsäurefällung nach V a u g h n und Mitarbeitern ¹⁰⁹ und eine Salzfällung mit Ammoniumsulfat nach W o l f s o n und Mitarbeitern ¹¹⁵ bringen hinsichtlich der Lokalisation des Rheumafaktors keine Verbesserung.

M i c h e l i und Mitarbeiter ⁶⁵ glauben, daß die Agglutinationsaktivität des Euglobulin-Präzipitats oder des Überstandes allein vom End-pH der Präperationslösung abhängig ist. Sie konnten das bei Versuchen mit der Dialyse-Fraktionierungsmethode nach Z i f f und Mitarbeitern ¹¹⁸, der Kältepräzipitation nach S v a r t z und S c h l o s s m a n n ¹⁰³ und bei ihrer Methode einer Ausfällung durch einen niedermolekularen Phosphatpuffer ⁶⁵ feststellen. Bei günstigstem End-pH von 5,93 wurde die Aktivität vorwiegend bis ausschließlich im Präzipitat gefunden, dagegen bei einem End-pH von 7,58 vorwiegend im Überstand. Am günstigsten erwies sich ein pH von 5,93 bei der Fraktionierungsmethode von Z i f f und Mitarbeitern ¹¹⁸, bei der die Rheumafaktor-Aktivität in den meisten Fällen in der gewonnenen Fraktion erscheint, während der Überstand meist inaktiv war. Der ungünstigste pH-Wert bei der Kältepräzipitation war 7,58 und hierbei fand sich die Aktivität mehr im Überstand als im Präzipitat. Diese Ergebnisse liefern neue Aspekte bezüglich der Möglichkeiten, durch Serum-Fraktionierungen den Rheumafaktor einzuengen.

M i c h e l i und Mitarbeiter ⁶⁵ stellten aber im Gegensatz zu S v a r t z und S c h l o s s m a n n ¹⁰⁴ fest, daß bei der Aktivitätsverteilung auf Präzipitat und Überstand kein Unterschied der Agglutination im Test mit sensibilisierten Schaf-Erythrozyten und im Latex-Fixations-Test hinsichtlich positiver Ausfälle bei chronischer Polyarthrit, Lupus erythematosus, Leberzirrhose oder anderen unspezifischen Agglutinations-Faktoren bestand. Es ergab sich also keine Möglichkeit, den Rheumafaktor von Anti- γ -Globulinen bei anderen Erkrankungen durch Fraktionierungsmethoden abzutrennen.

Untersucht man mit der Ultrazentrifuge eine γ -Globulin-Fraktion, auch normaler Seren, die man elektrophoretisch gewonnen hat, so erhält

man eine schnelle Komponente von einer Sedimentationskonstanten von 19 S (Molekulargewicht 950 000 - 1 000 000) und eine langsam sedimentierende Komponente von 7 S (Molekulargewicht etwa von 160 000). In ihren Untersuchungen fanden C l e v e und B e h r e n d ⁷ durch wiederholtes Zentrifugieren von Rheumaseren ein Makro-Globulin-Präparat mit angereicherter Rheumafaktor-Aktivität, das sich immunoelektrophoretisch als β_{2M} -Globulin, α_2 -Makro-Globulin, sowie auch in kleinem Maße als niedermolekulares γ -Globulin erwies. Der Rheumafaktor soll sich in dem β_{2M} -Globulin befinden. Auch S v a r t z ^{96,97} und S v a r t z und Mitarbeiter ⁹⁸ lokalisierten den Rheumafaktor in die Makro-Globulin-Fraktion mit einer Sedimentationskonstanten von 19 S (MG etwa 900 000) und etwas geringer (18,7 S). In weiteren Untersuchungen reinigten S v a r t z und Mitarbeiter ^{98,96} das Kältepräzipitat durch Chromatographie mit dem Kationenaustauscher Carboxymethylcellulose und untersuchten die einzelnen Fraktionen hinsichtlich ihrer Hämagglutination und diejenige Fraktion mit dem höchsten Agglutinationstiter mit der Ultrazentrifuge. Eine Sedimentationskonstante von 18 - 19 S wurde hierbei festgestellt. Nach diesen Untersuchungen kann angenommen werden, daß der Rheumafaktor ein β_2 -Makro-Globulin mit einer Sedimentationskonstanten von 19 S ist.

M ü l l e r - E b e r h a r d und Mitarbeiter ⁷⁷, F r a n k l i n und Mitarbeiter ²⁸ sowie S v a r t z ⁹⁷ entdeckten neben der physiologischen 19 S-Komponente in Seren von Patienten mit chronischer Polyarthritiden einen ungewöhnlich hochmolekularen Komplex mit einer Sedimentationskonstanten von 22 S. M ü l l e r - E b e r h a r d ⁷⁴ wies nach, daß es kein atypisches Protein ist und daß die 22 S-Komponente verschwindet, wenn zu der Euglobulin-Fraktion, die diese schwere Komponente enthält, 3-6-molare Harnstofflösung gegeben wird. Die 22 S-Komponente kann nicht mehr mit der Ultrazentrifuge nachgewiesen werden, dagegen nimmt die Konzentration von 19 S- und 7 S-Globulinen zu. Der 22 S-Komplex tritt nach Dialyse des Harnstoffes gegen 5 %ige NaCl-Lösung wieder auf. Es muß also ein reversibler dissoziierbarer Komplex sein. F r a n k l i n und Mitarbeiter ²⁸

und M ü l l e r - E b e r h a r d und Mitarbeiter ⁷⁷ konnten die Rheumafaktoraktivität des 22 S-Komplexes nachweisen. F r a n k l i n und Mitarbeiter ²⁹ stellten eine Parallelität zwischen der Menge der 22 S-Komplexe und der Intensität der Präzipitation und der Hammelblutkörperchen-Agglutination auf. Nach diesen Autoren findet sich diese hochmolekulare Komponente allein in der γ -Globulin-Fraktion und der 22 S-Komplex soll aus 50 % 7 S- und 50 % 19 S-Material bestehen.

K u n k e l und Mitarbeiter ⁵¹ dissoziierten den 22 S-Komplex in Euglobulin-Fractionen oder Präzipitaten durch Glykokoll-Puffer (pH 3) und wiesen nach Ultrazentrifugieren mit Stabilisierung der Zonen durch einen Dichtegradienten und Trennung durch schichtenweises Abpipettieren oder Auffangen in einen Fraktionssammler nach, daß die neben der 7 S-Globulin vorkommende 19 S-Komponente serologisch hochaktiv ist. Nach M ü l l e r - E b e r h a r d ⁷⁴ liegt hier eine Bindung des Rheumafaktors auf Grund seiner pathologischen Fähigkeit vor, γ -Globulin an sich zu lagern. Da die Löslichkeitsgrenze nicht überschritten wird, tritt keine Präzipitation auf. Vielleicht kommt auch keine Präzipitation zustande, da keine Veränderung der 7 S-Globuline, keine Aggregate, vorliegen.

Nach Untersuchungen von M ü l l e r - E b e r h a r d ⁷⁴ und Mitarbeitern ⁷⁷ lösen sich die Präzipitate des Rheumafaktors mit aggregiertem Gamma-Globulin in 3-6-molarer Harnstoff-Lösung oder in Glykokoll-Puffer pH 3. Mit der Ultrazentrifuge wird eine 19 S-, 7 S- und auch Komponenten mit niedriger Sedimentationskonstanten nachgewiesen, die den γ -Globulin-Aggregaten entsprechen. Kann man in Rheumaseren nicht immer diese 22 S-Komponente nachweisen, so beruht das möglicherweise auf der relativ geringen Empfindlichkeit der Ultrazentrifugenuntersuchungen.

K u n k e l und Mitarbeiter ⁵³ haben in weiteren Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge einen "neuen Komplex" mit einer Sedimentationskonstanten von 10 - 15 S gefunden. In 4-6-molarer Harnstoff-Lösung

und in Säurepuffer dissoziiert dieser Komplex und mit der Ultrazentrifuge lassen sich 7 S-Komponenten nachweisen, die immunologisch als γ -Globuline bestimmt werden. K u n k e l⁵⁰ wirft die Frage auf, ob es sich bei diesem sog. "Intermediär-Komplex" um eine Verbindung eines 7 S-Rheumafaktors mit anderen 7 S- γ -Globulinen handelt. Der "Intermediär-Komplex" dissoziiert nach T o m a s i (zit. 50) bei der Dialyse gegen ein pH von 3,5 und bildet sich wieder bei pH 7. Disulfid-Bindungen scheinen keine vorzuliegen, da durch Behandlung mit 10-molarem β -Merkaptoaethanol keine Dissoziation eintritt. War ein "Intermediär-Komplex" nachzuweisen, so war dieser im Latex-Fixations-Test stark positiv, wie 19 S- und 7 S-Globuline, während in Rheumaseren ohne Intermediär-Komplex (anscheinend auch ohne 22 S-Komplex) nur das 19 S-Globulin agglutinationsaktiv war. Seren mit Intermediär-Komplex verloren bei der Sulfhydrylreduktion mit β -Merkaptoaethanol die Hälfte ihrer Aktivität, dagegen hatten die Seren ohne Intermediär-Komplex einen vollkommenen Aktivitätsverlust. Aus diesen Versuchen wird gefolgert, daß der Intermediär-Komplex aus einem 7 S-Rheumafaktor, der einen Komplex mit 7 S- γ -Globulin bildet, besteht, was dem 22 S-Komplex aus 19 S- und 7 S-Globulin entspricht.

Über die Methode von K u n k e l und Mitarbeitern⁵¹, der Dissoziation von 22 S-Komplexen und dem Nachweis des Rheumafaktors mit der Ultrazentrifuge, führten die experimentellen Untersuchungen zur Isolierung des Rheumafaktors von M a t h i e s und Mitarbeitern⁶² zu einer reinen Darstellung des agglutinationsaktiven Globulins. Die Methodik beruht auf dem Prinzip der Abspaltung des vorher an mit γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) beladene Latex-Partikelchen gebundenen sogenannten Rheumafaktors.

Der Rheumafaktor wird durch Zugabe eines hochtitrigen Patientenserums zu einer Latex- γ -Globulin-Suspension an die mit γ -Globulin beladenen Latex-Partikelchen gebunden. Die überstehende Flüssigkeit (Serum und Pufferlösung) wird nach dem Zentrifugieren abgesaugt, die mit γ -Globulin beladenen Latex-Partikelchen mit dem daran gebundenen Rheumafaktor

mehrfach in Pufferlösung gewaschen und nach dem letzten Zentrifugieren wieder mit Pufferlösung auf das Ausgangsvolumen des Serums aufgefüllt und durch Schütteln suspendiert. Die Absprengung erfolgt durch Erwärmen auf 63-65°C im Wasserbad, oder, wie später zu zeigen sein wird, schon ab 60°C, woraufhin der Rheumafaktor nach Zentrifugieren in der Wärme in der überstehenden Pufferlösung erscheint. Mit diesem Verfahren gelang es, den Rheumafaktor ohne wesentliche Verluste in eine Pufferlösung zu überführen. Das Mischungsverhältnis von Rheumaserum zu Pufferlösung zu Latex- γ -Globulin-Suspension von 1:10:10 erwies sich am günstigsten für die Ausbeute an isoliertem Rheumafaktor. Die Temperatur darf 66°C nicht überschreiten, da über 66°C möglicherweise eine Denaturierung des Rheumafaktors eintritt und der Tropfen-Test hierbei negativ wird. Die Latex- γ -Globulin-Suspension zeigt bei Erwärmung über 76°C eine Konglomeration, die einer positiven Agglutination ähnlich sieht, womit die Latex-Suspension nicht mehr zum Tropfen-Test zu verwerten ist. Die Absprengung des Rheumafaktors kann rückgängig gemacht werden, wenn der Überstand nicht sofort abgehoben wird, sondern das Zentrifugenglas für 30 min auf 37°C im Brutschrank abkühlt.

Auffallend war, daß nach Absprengung des Rheumafaktors der in Pufferlösung aufgeschwemmte Bodensatz eine Agglutination der Latex-Partikelchen zeigte und damit nicht wieder zur Durchführung eines Tropfen-Testes verwendbar war. Daß es sich hierbei um einen nicht abgesprengten Anteil an Rheumafaktor handeln könnte, wurde ausgeschlossen. Die Konglomeration trat auch auf, wenn der gesamte Untersuchungsgang ohne Serum oder mit Normalserum durchgeführt wurde. Keinen Einfluß hatte das alleinige Zentrifugieren. Wird danach der Bodensatz in Pufferlösung gelöst, im Wasserbad auf 65°C unter mehrmaligem Aufschütteln erwärmt, wieder zentrifugiert und dann auf 37°C abgekühlt, so sind die Latex-Partikelchen, zumindest teilweise, suspendiert und lassen sich zur Durchführung des Tropfen-Testes mit positivem Rheumatiker-serum verwenden.

Es wurde daher angenommen, daß der Grund der Konglomeration der Latex-Partikelchen ebenfalls in einer Absprengung der γ -Globuline (Cohn-Fraktion II) bei 65°C zu suchen ist, die damit auch in den Überstand wandern. Es müßte dann zu einer Bindung des Rheumafaktors an γ -Globulin im Überstand kommen, wofür allerdings kein Anhalt bestand.

M a t h i e s ⁶³ führt folgende Punkte, die gegen die γ -Globulin-Absprengung sprechen, an. Der Rheumafaktor müßte bei Mitabsprengung aus der Latex- γ -Globulin-Beladung nach Wiederabkühlen wieder eine Reaktion mit diesem mitabgesprengten γ -Globulin eingehen. Das ist jedoch nicht der Fall, da der abgesprengte Rheumafaktor auch nach Absprengung reaktionsfähig bleibt. Es mußte auch angenommen werden, daß außer γ -Globulin andere, in der Cohn-Fraktion II enthaltene Proteine mitabgesprengt werden müßten, die man immunologisch nachweisen könnte. Man kann immunologisch die Absprengung eines 7 S- γ -Globulins nachweisen, was aber als Komponente eines 22 S-Komplexes angesehen wurde. Andere Proteine wurden nicht mitabgesprengt, da sie immunologisch nicht zu sehen waren. Auch konnte die Absprengung von 7 S- γ -Globulinen bei zwei Fällen nur in einem Fall gefunden werden, die man in beiden Fällen jedoch hätte finden müssen. Es könnte sich auch um einen Denaturierungsvorgang handeln.

Zur weiteren Klärung dienen folgende eigene Versuche:

Eigene Untersuchungen

=====

A.) Material, Reagentien und apparative Ausrüstung

1) Rheumafaktor Isolierung

- a) Hochtitriges Rheumatiker-Serum (RS)
- b) Suspension mit γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) beladener Latex-Partikelchen (Reagenz der Hyland Laboratories) (LyGS)
- c) Glycine-Saline Pufferlösung pH 8,2 (Reagenz der Hyland Laboratories) (PL)
- d) Brutschrank 37°C
- e) Wasserbad mit Thermostat
- f) Zentrifuge mit wärmeisolierten Einsätzen nach eigener Anfertigung.
Als Isolierungsmaterial wurde Styropor verwendet. Die Einsätze wurden vorgewärmt.

2) Latex-Tropfen-Test

- a) Rheumatiker-Serum
- b) Suspension mit γ -Globulin (Cohn-Fraktion II) beladener Latex-Partikelchen (Reagenz der Hyland Laboratories) (LyGS)
- c) Glycine-Saline Pufferlösung pH 8,2 (Reagenz der Hyland Laboratories) (PL)
- d) Objektträger an der Unterseite schwarz lackiert

B.) Methodiken

(Methodik bei M a t h i e s und Mitarbeiter ⁶²⁾)

1) Rheumafaktor Isolierungsmethode

1 Teil eines hochtitrigen Rheumatiker-Serums (RS) wird mit 10 Teilen Glycine-Saline Pufferlösung (PL) und 10 Teilen einer Suspension von mit γ -Globulin beladenen Latex-Partikelchen (LyGS) in ein Zentrifugenglas zusammengegeben, 30 Minuten in den Brutschrank (37°C) gestellt und zwischenzeitlich mehrmals aufgeschüttelt. Anschließend wird 7 Minuten bei 2000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert. Der Überstand wird sofort abgehoben und im Tropfen-Test titriert (1. Überstand). Zweimal wird dann der Bodensatz mit eiskaltem Puffer gewaschen, d.h. der Bodensatz wird in eiskaltem Puffer gelöst und anschließend zentrifugiert, wiederum 7 Minuten bei 2000 Umdrehungen in der Minute; der Überstand wird verworfen. Der Bodensatz wird dann in Pufferlösung, und zwar in $3/4$ des Ausgangsvolumens unter Berücksichtigung des Materialverlustes suspendiert und bei 65°C im Wasserbad für 12 Minuten erhitzt, wobei zwischenzeitlich umgeschüttelt wird. Sofort anschließend wird bei der gleichen Temperatur 3 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und im Tropfen-Test titriert (letzter Überstand).

2) Latex-Tropfen-Test

(Methodik bei G u m und S m i t h ³⁹⁾)

0,05 ml Serum werden zu 1 ml Pufferlösung gegeben, wodurch eine Anfangsverdünnung von 1:20 entsteht; dann wird eine geometrische Verdünnungsreihe bis 1:1280 hergestellt.

Von jeder Verdünnung werden 0,05 ml auf einen geschwärzten Objektträger gegeben und mit 0,05 ml der Latex-Suspension (LyGS) vermischt. Nach 3 Minuten unter vorsichtigen Kippbewegungen wird die Agglutination abgelesen.

C.) Versuchsreihen

I) Einfluß der einzelnen Vorgänge in Hinsicht auf die Konglomeration (Die Versuche wurden ohne Serum ausgeführt)

Versuchsreihe 1

Hitzeeinfluß auf die Latex-Suspension (LyGS)

Versuchsanordnung

2 ml Latex-Suspension (LyGS) und 2,2 ml Pufferlösung (PL) wurden in ein Reagenzglas gegeben und im Wasserbad 12 Minuten auf verschiedene Temperaturen (61°C, 62°C, 63°C) und 30 Minuten auf 63°C erhitzt. Die Proben wurden auf eine gleichmäßige Suspension hin - sowohl im Reagenzglas als auch mit der Lupe auf dem geschwärzten Objektträger - untersucht und anschließend ihre Verwendbarkeit zum Latex-Tropfen-Test geprüft.

Ergebnis

Tabelle 1

Temperatur	Zeit	Suspension	zu Latex-Tropfen-Test
61°C	12 min	gleichmäßige S.	verwendbar
62°C	12 min	gleichmäßige S.	verwendbar
63°C	12 min	gleichmäßige S.	verwendbar
63°C	30 min	feinste Konglom.	noch verwendbar

Das Erwärmen für 12 Minuten in diesem Temperaturbereich hat keine Konglomeration zur Folge. Erwärmt man dagegen länger (30 min) tritt bereits eine feinste Konglomeration auf. Die Suspension ist zur Durchführung des Latex-Tropfen-Testes zu verwenden.

Versuchsreihe 2

Der Einfluß des Zentrifugierens auf die Latex-Suspension (LyGS)

Versuchsanordnung

Es wurde das gleiche Mischungsverhältnis wie in der ersten Versuchsreihe gewählt. Die Suspension wurde 7 Minuten bei 2.000 U/min zentrifugiert. Die Proben wurden auf verschiedene Temperaturen (61°C , 62°C , 63°C) im Wasserbad für 12 Minuten erhitzt und anschließend zentrifugiert (7 min 2.000 U/min) und hinsichtlich der Gleichmäßigkeit der Suspension untersucht.

Ergebnis

Sowohl das alleinige Zentrifugieren als auch das Erwärmen mit anschließendem Zentrifugieren übte keinen Einfluß auf die gleichmäßige Suspension aus.

Versuchsreihe 3

Einfluß der einzelnen Vorgänge bei der Methode der Rheumafaktor-Isolierung auf die Latex-Suspension.

Versuchsanordnung

Es wurde wiederum das gleiche Mischungsverhältnis wie in der ersten Versuchsreihe gewählt. Diese Suspension wurde dem Vorgang wie bei der Rheumafaktor-Isolierung unterworfen. Nach jedem Versuchsgang wurden die Proben hinsichtlich der Gleichmäßigkeit ihrer Suspension untersucht.

Ergebnis

<u>Versuchsgang</u>	<u>Suspension</u>
a) 30 min bei 37°C im Brutschrank:	gleichmäßige S.
b) 7 min bei 2.000 U/min Zentrifugieren:	gleichmäßige S.
c) 2 mal Waschen mit eiskaltem Puffer:	feinste Konglomeration
d) 12 min im Wasserbad bei 60°C erhitzt:	sehr feine Konglomeration
e) sofortiges Zentrifugieren für 3 min bei 1.500 U/min:	feine Konglomeration, zu Latex-Tropfen-Test verwendbar

II) Bestimmte Kontrollversuche mit Normal-Serum

Einfluß des Serums auf die Konglomeration

Versuchsanordnung

0,2 ml Normal-Serum (NS), 2 ml Latex-Suspension (LyGS) und 2 ml Pufferlösung (PL) wurden in ein Reagenzglas gegeben und dem Vorgang wie bei der Rheumafaktor-Isolierung unterworfen, wobei jeder Versuchsgang einzeln hinsichtlich der Gleichmäßigkeit der Suspension untersucht wurde. Der Versuchsgang (a, b, c, d, e) entspricht dem in Versuchsreihe 3 I.

Ergebnis

<u>Versuchsgang</u>	<u>Suspension</u>	<u>zu Latex-Tropfen-Test</u>
a)	gleichmäßige S.	verwendbar
b)	gleichmäßige S.	verwendbar
c)	feinste Konglomeration	verwendbar
d)	sehr feine Konglomeration	noch verwendbar
e)	feine Konglomeration	noch verwendbar

Die Konglomeration tritt im Laufe des Untersuchungsganges sowohl ohne Serum als auch mit Normalserum an der gleichen Stelle auf.

Das Serum hat also keinen Einfluß auf die Konglomeration.

(I) Änderung der Versuchsbedingungen bei Rheumafaktor-Isolierung

Versuchsreihe 1

Verschiedene Mischungsverhältnisse und ihr Einfluß auf die Konglomeration und die Rheumafaktor-Ausbeute.

Versuchsanordnung

Es wurde nach der üblichen Methode der Rheumafaktor-Isolierung vorgegangen. Das Mischungsverhältnis wurde variiert, indem die Menge der Latex-Suspension (1 ml LyGS) und die Menge der Pufferlösung (1 ml PL) konstant gehalten wurde, während die Menge des Rheumatiker-Serums (Titer 1:320) (0,025, 0,075, 0,1, 0,125, 0,150, 0,2 ml) geändert wurde. Die Absprengungstemperatur war 63°C.

Der letzte Bodensatz wurde jeweils in Pufferlösung gegeben und kräftig aufgeschüttelt und auf dem schwarzlackierten Objektträger mit der Lupe hinsichtlich der Konglomeration untersucht. Mit dem Latex-Tropfen-Test wurde der Titer des "ersten Überstandes" und des "letzten Überstandes" bestimmt.

Ergebnis

Das Mischungsverhältnis hatte auf die auftretende Konglomeration keinen merklichen Einfluß. Die Ausbeute an isoliertem Rheumafaktor bei verschiedenem Mischungsverhältnis zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2

Agglutinationsgrad bei verschiedenen Mischungsverhältnissen

		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
1. RS 0,025 ml	Serumtiter	+++	+++	+++	+++	++	+	(+)	ø
	1. Überstand		+++	++	++	(+)	ø		
	letzter Überstand		+++	+++	++	+	(+)	ø	
2. RS 0,075 ml	1. Überstand		+++	++	++	(+)	ø		
	letzter Überstand	+++		++	++	+	(+)	ø	
3. RS 0,1 ml	1. Überstand		+++	+++	++	+	(+)	ø	
	letzter Überstand	+++	+++	+++	++	+	+	ø	
4. RS 0,125 ml	1. Überstand		+++	+++	+++	++	+	(+)	ø
	letzter Überstand	+++	+++	++	+	(+)	(+)	ø	
5. RS 0,150 ml	1. Überstand	+++	+++	+++	++	+	(+)	ø	
	letzter Überstand	+++	+++	++	+	+	(+)	ø	
6. RS 0,2 ml	1. Überstand	+++	+++	+++	+++	++	+	(+)	ø
	letzter Überstand	+++	+++	++	+	(+)	ø		

Versuchsreihe 2

Einfluß der Absprennungstemperatur auf die Konglomeration. (Die Versuche wurden mit Normal-Serum ausgeführt)

Versuchsanordnung

0,2 ml Normal-Serum (NS), 2 ml Pufferlösung (PL) und 2 ml Latex-Suspension (LyGS) werden zusammengegeben und dem Vorgang wie bei der Rheumafaktor-Isolierung unterworfen. In den einzelnen Versuchen wurden verschiedene Absprennungstemperaturen (von 63°C abwärts) angewandt.

Der letzte Bodensatz wurde in Pufferlösung suspendiert und sowohl im Reagenzglas als auch mit der Lupe auf dem geschwärzten Objektträger hinsichtlich der Konglomeration untersucht. Anschließend wurde noch die Verwendbarkeit zum Latex-Tropfen-Test geprüft.

Ergebnis

Tabelle 3

Temperatur	63°C	62°C	61°C	60°C	59°C
Konglomeration zu Latex-Test verwendb.	deutliche nicht	deutliche nicht	feinere fraglich	feine möglich	sehr feine gut mögl.

Versuchsreihe 3

Änderung der Absprennungstemperatur (Parallel-Versuch mit Rheumatiker-Serum)

Versuchsanordnung

Es wurde wie bei der letzten Versuchsreihe vorgegangen. Statt Normal-Serum wurde Rheumatiker-Serum (Titer 1:320) verwendet.

Die Ausbeute an Rheumafaktor wurde durch Titerbestimmung des "letzten Überstandes" im Vergleich zum Titer des Ausgangsmaterials im Latex-Tropfen-Test festgestellt. Der Bodensatz wurde in Pufferlösung suspendiert und hinsichtlich der Konglomeration betrachtet.

Ergebnis

Tabelle 4

Absprengungstemp. Serum-Ausgangstiter "letzter Überstand"			Bodensatz (Konglomeration)
63°C	1:320	1:160	+++
62°C	1:320	1:160	+++
61°C	1:320	1:160	+++
60°C	1:320	1:160	+++
59°C	1:320	∅	+++

Der Rheumafaktor läßt sich also bereits bei 60°C absprengen, während bei 59°C kein Rheumafaktor im "letzten Überstand" gefunden wurde. Der Bodensatz, der in Pufferlösung suspendiert wurde, zeigte eine starke Konglomeration und konnte zur Durchführung des Latex-Tropfen-Tests nicht mehr verwendet werden.

Versuchsreihe 4

Reversibilität der Konglomeration

Versuchsanordnung

0,2 ml Normalserum (NS), 2 ml Latex-Suspension (LyGS) und 2 ml Pufferlösung (PL) wurden in ein Zentrifugenglas zusammengegeben und dem Vorgang wie bei der Rheumafaktor-Isolierung unterworfen. Als Absprengungstemperatur wurde 63°C gewählt. Der "letzte Überstand" wurde nicht abgehoben, sondern nach Durchmischung mit dem Zentrifugat und kräftigem Schütteln im Brutschrank für 30 Minuten bei 37°C wieder abgekühlt. Anschließend wurde die Probe hinsichtlich der Konglomeration untersucht.

Ergebnis

Die Konglomeration bleibt auch nach Wiederabkühlung unverändert bestehen.

D i s k u s s i o n

=====

Das alleinige Erwärmen im Rheumafaktor-Absprengungsbereich für 12 Minuten, das Zentrifugieren und auch das Erwärmen + Zentrifugieren entsprechend der Isolierungsmethode führt nicht zur Konglomeration. Die Dauer des Untersuchungsgangs spielt dagegen eine entscheidende Rolle. Wird die Latex-Suspension (LyGS) 30 Minuten bei 63°C erwärmt, tritt bereits eine feinste Konglomeration auf. Bei dem gesamten Untersuchungsgang tritt eine feinste Konglomeration nach wiederholtem Zentrifugieren und Wiederauflösen bereits vor dem Erhitzen auf, die sich im Laufe des Untersuchungsgangs bei Erhitzen noch verstärkt. Keinen Einfluß auf die Konglomeration hat Normal-Serum und auch das Mischungsverhältnis. Die Konglomeration ist jedoch auch vorhanden, wenn auch geringer, wenn man mit der Absprengungstemperatur bis 60°C heruntergeht. Bei 59°C ist eine Absprengung des Rheumafaktors nicht mehr möglich, obwohl noch bei dieser Temperatur eine Konglomeration der Suspension deutlich wird. Die Konglomeration kann auch nicht rückgängig gemacht werden, wenn - nach dem Absprengungsvorgang mit Normal-Serum statt Rheumaserum - der "letzte Überstand" nicht abgehoben wird, sondern mit dem Zentrifugat durchmischt und im Brutschrank wieder abgekühlt wird.

Die Versuchsergebnisse haben also insgesamt gezeigt, daß eine Konglomeration der Latex-Partikel, wenn auch in geringem Ausmaß, bereits eintreten kann, wenn die Erwärmung auf die notwendige Absprengungstemperatur noch nicht erreicht wird. Das zeigte sich in dem Versuch mit einer Erwärmung auf 59°C , bei der der Rheumafaktor nachweislich noch nicht abgesprengt wurde, wie ebenfalls in der Feststellung, daß die erste feinste Konglomeration im Laufe des Untersuchungsganges bereits vor dem Erwärmen bei Waschen mit eiskaltem Puffer auftritt. Oberhalb einer Temperatur von 59°C ist eine Abhängigkeit des Konglomerationsgrades von der Temperatur beim Absprengungsvorgang des Rheumafaktors nicht zu beobachten. Unterwirft man aber ein Normal-

serum dem gleichen Untersuchungsgang, so nimmt der Konglomerationsgrad mit steigender Temperatur kontinuierlich zu. Eine Erklärung für dieses Verhalten kann nicht gegeben werden. Selbst wenn man annehmen wollte, daß aggregiertes γ -Globulin bei Erhitzen auf $60-65^{\circ}\text{C}$ von seiner Bindung an Latex-Partikel abgesprengt würde, wobei die Absprengung bei vorheriger Reaktion mit Rheumafaktor verstärkt vonstattengeinge, bliebe unerklärlich, warum bei einer Erhitzung auf 59°C bereits eine deutliche Konglomeration auftritt, ohne daß Rheumafaktor abgesprengt wird.

Auch andere Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Absprengung von aggregiertem γ -Globulin, mit dem die Latex-Partikel beladen sind, im Rahmen des Rheumafaktor-Isolierungsvorgangs unwahrscheinlich ist. So müßte der abgesprengte Rheumafaktor mit den mitabgesprengten γ -Molekülen eine Reaktion eingehen und nicht mehr im Agglutinationstest wirksam sein, vorausgesetzt, daß man annehmen will, daß die γ -Globulin-Moleküle nach Absprengung von der Latex-Oberfläche nicht wieder in unaggregiertem Zustand erscheinen.

Es konnte zumindest gezeigt werden ⁶³, daß der abgesprengte Rheumafaktor im Agglutinationstest vollaktiv ist und deshalb keine Reaktion mit aggregiertem γ -Globulin eingegangen sein kann. Da außerdem die Beladung der Latex-Partikel mit Cohn-Fraktion II erfolgt, die außer 7 S- γ -Globulinen auch andere Serumproteine enthält, wäre nicht verständlich, warum nicht auch diese im Verlauf des Absprengungsvorgangs im Überstand erscheinen sollten. Solche Proteine wurden jedoch immunoelektrophoretisch neben dem abgesprengten Rheumafaktor nicht gefunden. Wenn manche Rheumafaktoren außer einem β_2 -Makro-Globulin auch ein 7 S- γ -Globulin bei der immunologischen Untersuchung erkennen lassen, so kann dieses darauf zurückgeführt werden, daß ein 22 S-Komplex vorlag, der bekanntlich aus einem 19 S- und einem 7 S- γ -Globulin besteht. Da jedoch auch Rheumafaktoren gefunden werden, die kein 7 S- γ -Globulin aufweisen, kann die grundsätzliche Mitabsprengung von γ -Globulin, mit dem die Latex-Partikel beladen waren, nicht angenommen werden.

Es ist demnach zu diskutieren, ob die Latex- γ -Globulin-Suspension eine Empfindlichkeit aufweist, die sich hinsichtlich ihrer gleichmäßigen Suspension in der Anfälligkeit gegen die verschiedensten Einflüsse äußert. So hat sich z.B. gezeigt, daß es nicht möglich ist, nach Exsikkation durch Auflösen in Pufferlösung eine gleichmäßige Suspension herzustellen. Auch konnten wir durch die oben angeführten Untersuchungen zeigen, daß eine Erhitzung der Suspension für 30 Minuten auf 63°C bereits eine beginnende Konglomeration auslöst, obwohl eine Erhitzung für 12 Minuten bei gleicher Temperatur die gleichmäßige Suspension nicht beeinflusst. Da der Rheumafaktor-Isolierungsvorgang mit Rheumatikerserum prinzipiell zur gleichen Konglomeration führt gegenüber demselben Untersuchungsgang mit Normalserum statt Rheumaserum, könnte höchstens angenommen werden, daß bei Verwendung von Normalserum ebenfalls γ -Globulin von der Latex-Oberfläche abgesprengt wird. In diesem Fall müßte sich nach Abkühlen das γ -Globulin jedoch wieder an die Latex-Partikel anlagern können, da auch der Absprengungsvorgang des Rheumafaktors durch Wiederabkühlung ebenfalls reversibel ist.

Unsere Versuche haben jedoch gezeigt, daß die Konglomeration nicht verschwindet, wenn man den Absprengungsvorgang mit Normalserum statt mit Rheumaserum durchführt und den Überstand nach Durchmischung mit dem Zentrifugat wieder abkühlt. Auch dieser Versuch spricht dafür, daß die Konglomeration nicht durch eine Absprengung der γ -Globulin-Moleküle bedingt ist.

Zusammenfassend bewiesen die Untersuchungen nicht, daß beim Isolierungsvorgang des Rheumafaktors γ -Globulin-Moleküle, mit denen die Latex-Partikel beladen sind, mitabgesprengt werden. Es finden sich vielmehr, besonders im Zusammenhang mit anderen Befunden, Anhaltspunkte dafür, daß die Latex- γ -Globulin-Bindung erhalten bleibt und die beobachtete Konglomeration durch eine Empfindlichkeit der Latex-Suspension gegen die Untersuchungseinflüsse bedingt ist.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurden Untersuchungen durchgeführt, die der Beantwortung der Frage dienen sollten, ob bei der Rheumafaktor-Isolierung nach der Methode von M a t h i e s und Mitarbeitern ⁶² der Komplex der Latex-Partikel mit 7 S- γ -Globulinen stabil bleibt. Es zeigte sich, daß nach dem Isolierungsvorgang die Latex- γ -Globulin-Suspension sowohl bei Verwenden von Rheumaserum als auch Normalserum nicht mehr zum Latex-Agglutinations-Test verwendbar ist. Dennoch wurden Anhaltspunkte gefunden, daß diese Tatsache nicht auf eine Mitabsprengung des aggregierten γ -Globulins beruhen mußte, sondern durch eine Empfindlichkeit der Suspension gegenüber verschiedener experimenteller Vorgänge bedingt sein kann. Im übrigen haben die Versuche gezeigt, daß die Absprengung des Rheumafaktors im Temperaturbereich zwischen 60°C und 65°C möglich ist.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) Abrams, A., Cohen, F.F. and Meyer, C.O.: J. Biol. Chem. 181, 237 (1949); zit.: Svartz, M. u. Schlossmann, K.: (136)
- 2) Adler, F.L.: Antibody formation after injection of heterologous immune globulin. J. Immunol. 76, 217 (1956)
- 3) Antonaci, B.L., Ravaieli, F., Braconi, M., del Giovane, L. e Ravenni, G.: Localizzazione del fattore reumatoide nelle sieroproteine e sua composizione in aminoacidi. Reumatismo 11, 346 (1959)
- 4) Ball, J. and Lawrence, J.S.: Epidemiology of the sheep cell agglutination test. Ann. rheum. Dis. 20, 235 (1961)
- 5) Bartfeld, H.: Immunologic and biologic similarities of seropositive rheumatoid and nonrheumatoid disease sera: Gel diffusion studie. J. Lab. clin. Med. 56, 303 (1960)
- 6) Behrend, T.: Epidemiologische Untersuchungen über chronisch-entzündliche Rheumatismusfolgen in der Bevölkerung und in Arthritiker-Familien. Z. Rheumaforsch. 22, 379 (1963)
- 7) Behrend, T. u. Cleve, H.: Immuno-elektrophoretische Untersuchungen von Ultrazentrifugenpräparationen bei primär chronischer Polyarthrit. Z. Rheumaforsch. 19, 121, 217 (1960)
- 8) Bernhard, G.C., Chong, W. and Talmage, D.W.: The Reaction of Rheumatoid Factor and Complement with γ -Globulin coated Latex. J. Immunol. 88, 750 (1962)
- 9) Black, A., Goldin, M., Poske, R.M. and Melmed, L.: Differentiation between rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus by sheep-cell agglutination tests. Arthritis Rheumatism 2, 99 (1959)
- 10) Bozicovich, J., Bunim, J.J., Freund, J. and Ward, S.E.: Bentonite flocculation test for rheumatoid arthritis. Proc. Soc. Exp. Biol. 97, 180 (1958)
- 11) Burby, G. and Behr, G.: The latex fixation test in rheumatoid arthritis. Lancet 1958/I, 1157
- 12) Burnet, F.M.: The clonal selection theory of acquired immunity. University press, Cambridge 195 9
- 13) Cecil, R.L., Nicholls, E.E. and Stainsby, W.J.: The etiology of rheumatoid arthritis. Amer. J. med. Sci. 181, 12 (1931)

- 14) Christ, P.: Serologische Reaktionen beim akuten und chronischen Gelenkrheumatismus und ihre klinische Bedeutung. Klin. Wschr. 39, 1097 (1961)
- 15) Christian, C.L.: Characterisation of the "reactant" (gamma globulin factor) in the F II precipitin reaction and the F II tanned sheep cell agglutination test. J. exp. Med. 108, 139 (1958)
- 16) Dawson, M.H., Olmstead, M. a. Boots, R.H.: Agglutination reaction with streptococcus hemolyticus. J. Immunol. 23, 187 (1932)
- 17) Deicher, H. u. Behrend, T.: Das γ -Globulin "Antigen" des Latex-Fixations-Tests. Z. Rheumaforsch. 20, 119 (1961)
- 18) Diekmanns, H. u. Fritze, E.: Das Caplansyndrom (Arthritis bei Sili-kose) Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 65, 411 (1959)
- 19) Dresner, E. a. Trombly, F.: The latex-fixation reaction in nonrheumatic Diseases. New Engl. J. Med. 261, 981 (1959)
- 20) Edelmann, G.M., Kunkel, H.G. and Franklin, E.C.: Interaction of the rheumatoid factor with antigen-antibody complexes and aggregated gammaglobulin. J. exp. Med. 108, 105 (1958)
- 21) Ellis, N.A. and Felix-Davies, D.: Serum complement, rheumatoid factor and other serum proteins in rheumatoid disease and systemic lupus erythematosus. Ann. rheum. Dis. 18, 215 (1959)
- 22) Epstein, W., Johnson, A. and Ragan, C.: Observations on a precipitin reaction between serum of patients with rheumatoid arthritis and a preparation (Cohn fraction II) of human gamma globulin. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 91, 235 (1956)
- 23) Eyquem, A., Guyet-Jeannin, N. et Podliacheuk, L.: Présence dans les immunserums anti-bactériens de facteurs anti-globulinique analogues a ceux de la polyarthrite chronique évolutive. Ann. Inst. Pasteur 96, 295 (1959)
- 24) Fallet, G.H., Meyer, K. et Scheidegger, J.J.: La réaction de fixation au Latex (F II LP) dans les affections rhumatismales et non rhumatismales. Ev. Rhum. 28, 159 (1961)
- 25) Francq, J.C., Eyquem, A., Podliacheuk, L. et Jacqueline, F.: Etude immuno-electrophorétique des rhumatismes inflammatoires chroniques. Ann. Inst. Pasteur 96, 413 (1959)
- 26) Franklin, E.C.: Precipitation reaction between rheumatoid factors and gamma globulin. Arthritis Rheumatism 3, 16 (1960)
- 27) Franklin, E.C.: The interactions of rheumatoid factors and gamma globulins. Atti del X. Congr. della lega internat. contro il reumatismo, Rom 3.-7.9.1961

- 28) Franklin, E.C., Holman, H.R., Müller-Eberhard, H.J. and Kunkel, H.G.: An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J. exp. Med.* 105, 425 (1957)
- 29) Franklin, E.C., Kunkel, H.G., Müller-Eberhard, H.J. and Holman, H.R.: Relation of high molecular weight proteins to the serological reactions in rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.* 16, 315 (1957)
- 30) Geidel, H., Selle, K. u. Schabinski, G.: Untersuchungen über den differentialdiagnostischen Wert der Komplementbestimmung bei rheumatischen und pararheumatischen Erkrankungen. *Z. ges. inn. Med.* 19, 68 (1964)
- 31) Germer, W.D., Göbel, P. u. Missmahl, H.P.: Modellversuch zum chronisch-rheumatischen Geschehen. *Verh. dtsch. Ges. Inn. Med.* 64, 349 (1958)
- 32) Grabar, P.: Die Rolle der Bluteiweißkörper bei der humoralen Abwehr. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 66, 279 (1960)
- 33) Grabar, P. et Burtin, P.: Analyse immuno-électrophorétique, Masson & Cie., Paris 1960
- 34) Grubb, R.: Agglutination of erythrocytes coated with "incomplete" anti-Rh by certain rheumatoid arthritis sera and some other sera. *Acta path. microbiol. Scand.* 39, 195 (1956)
- 35) Grubb, R.: Reaction of rheumatoid arthritis sera with a human antibody gamma globulin. *Acta rheum. Scand.* 3, 55 (1957)
- 36) Grubb, R.: Interactions between rheumatoid arthritis sera and human gamma globulin. *Acta haemat.* 20, 246 (1958)
- 37) Grubb, R.: The relationship between the Gm serum groups and the rheumatoid arthritis serum factor, in Grabar, P. and Miescher, P.: *Immunopathologie, I. Internat. Symposion*, 359 (1958)
- 38) Grubb, R. and Laurell, A.B.: Hereditary serological human serum groups. *Acta path. microbiol. Scand.* 39, 390 (1956)
- 39) Gum, O.B. and Smith, C.J.: Arthritis Rheumatism 62, 2 (1959); zit.: Block, K.J.: Recent modifications in serological tests for rheumatoid arthritis. *Bull. rheum. Dis.* 9, 185 (1959)
- 40) Harboe, M.: Heterogenity of the "rheumatoid factor". *Atti del X. Congr. della lega internazionale contro il reumatismo*, Rom 3.-7.9.1961
- 41) Harboe, M. and Lundevall, J.: A new type in the Gm system. *Acta path. microbiol. Scand.* 45, 357 (1959)

- 42) Harter, F.: Der Latex-Test und die Agglutination mit sensibilisierten Schaferythrozyten im Kältepräzipitat im Rahmen der für die primärchronische Polyarthritits charakteristischen Serumveränderungen. Z. Rheumaforsch. 18, 150 (1959)
- 43) Heimer, R., Schwartz, E.R. and Freyberg, R.H.: J. Lab. Clin. Invest. 57, 16 (1961); zit.: Deicher, H. u. Schupp, E.: (24)
- 44) Heller, G., Jacobsen, A.S. and Kolodny, M.H.: A modification of the hemagglutination test for rheumatoid arthritis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 72, 316 (1949)
- 45) Heller, G., Jacobsen, A.S., Kolodny, M.H. and Kammerer, W.H.: The hemagglutination test for rheumatoid arthritis, II. The influence of human plasma fraction II (gamma Globulin) on the reaction. J. Immunol. 72, 66 (1954)
- 46) Heller, G., Kolodny, M.H., Lepow, I.H., Jacobsen, A.S., Rivera, M.E. and Marks, G.H.: The hemagglutination test for rheumatoid arthritis. J. Immunol. 74, 340 (1955)
- 47) Howell, D.S., Malcolm, J.M. and Pike, R.: The F II agglutination factors in serum of patients with non-rheumatic diseases. Amer. J. Med. 29, 662 (1960)
- 48) Kleine, N., Müller, W. u. Matthes, M.: Ein neues Verfahren zum Nachweis des Rheumafaktors mittels Streulichtmessung der Grenzschicht zwischen Patientenserum und Gammaglobulin. Z. Rheumaforsch. 17, 206 (1958)
- 49) Kunkel, H.G.: Immunologic aspects of rheumatoid arthritis. J. chron. Dis. 10, 418 (1959)
- 50) Kunkel, H.G.: The structure of rheumatoid factors, in: immunologic aspects of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism 6, 414 (1963)
- 51) Kunkel, H.G., Franklin, E.C. and Müller-Eberhard, H.J.: Studies on the isolation and characterisation of the "rheumatoid factor". J. clin. Invest. 38, 424 (1959)
- 52) Kunkel, H.G., and Fudenberg, H.H.: Auto- and iso-specificity of rheumatoid factors for gamma globulin. Atti del X. Congr. della lega internat. contro il reumatismo, Rom 3.-7.9.1961
- 53) Kunkel, H.G., Müller-Eberhard, H.J., Fudenberg, H.H. and Tomasi, T.B.: Gamma globulin complexes in rheumatoid arthritis and certain other conditions. J. clin. Invest. 40, 117 (1961)
- 54) Lamont-Havers, R.W.: Nature of serum factors causing agglutination of sensitized sheep cells and group A hemolytic streptococci. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 88, 35 (1955)

- 55) Laurell, A.B. and Grubb, R.: Complement, complement components, properdin and agglutination promoting factors in rheumatoid arthritis. *Acta path. microbiol. Scand.* 43, 310 (1958)
- 56) Lawrence, J.S. and Ball, J.: Genetic studies on rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.* 17, 160 (1958)
- 57) Lerner, E.M., Williams, R.R. and Jenkins, J.C.: The sensitized sheep cell hemagglutination reaction in rats with an experimental infection of bone and joint. *Proc. Soc. exp. Biol.* 99, 249 (1958)
- 58) LoSpalluto, J. and Ziff, M.: Chromatographic studies on the rheumatoid factor. *J. exp. Med.* 110, 169 (1959)
- 59) Mathies, H.: Der Rheumafaktor in der Rheumadiagnostik. *Med. Klin.* 55, 2028 (1960), dort weitere Literaturangaben.
- 60) Mathies, H.: Treffer- und Fehlerquote des Latextropfentestes zum Nachweis des Rheumafaktors bei Verwendung verschiedener Serumfraktionen und Reagentien. VII. Internat. Kongr. Inn. Med. München, 5.-8.Sept.1962
- 61) Mathies, H. u. Fürnrohr, S.: Die Treffer- und Fehlerquote des Latextropfentestes bei Verwendung von Vollserum, Euglobulinfraktion und Kältepräzipitat. *Klin. Wschr.* 40, 740 (1962)
- 62) Mathies, H., Imre, I. u. Schüle, V.: Experimentelle Untersuchungen zur Isolierung des Rheumafaktors. *Z. Rheumaforsch.* 22, 183 (1963)
- 63) Mathies, H.: Untersuchungen zur Natur und Reaktionsweise des Rheumafaktors und der Inhibitoren. Habilitationsschrift in Vorbereitung (1964)
- 64) Meyer, K.: Über Hämagglutininvermehrung und Hämagglutination fördernde Wirkung bei menschlichen Seren. *Z. Immunforsch.* 34, 229 (1922)
- 65) Micheli, A., Scheidegger, J.J., Fallet, G.H., Buzzi, C. et Spahr, J.: Etude du comportement euglobulinique des facteurs agglutinants dans la polyarthrite chronique évolutive et dans d'autres affections. *Bull. Acad. Suisse Sci. Méd.* 18, 16 (1962)
- 66) Miehleke, K., Kruppa, K.H. u. Schimanski, J.: Die serologischen Reaktionen zum Nachweis des Rheumafaktors. *Münch. med. Wschr.* 102, 382 (1960)
- 67) Miehleke, K. u. Puttnins, T.: Der serologische Nachweis des Rheumafaktors durch den Inhibitionstest. *Z. Rheumaforsch.* 18, 372 (1959)
- 68) Miehleke, K. u. Schimanski, J.: Die Agglutinationsreaktion zur Bestimmung des Rheumafaktors und ihr Wert für die Diagnose der chronischen rheumatoiden Polyarthrititis. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 65, 368 (1959)

- 69) Milgrom, F. and Witebsky, E.: Studies on the rheumatoid and related Serum factors, I. Autoimmunisation of rabbits with gamma globulin. J. Amer. med. Ass. 174, 56 (1960)
- 70) Müller, W.: Die Serologie der chronischen Polyarthrit. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962
- 71) Müller, W. u. Haftstein, F.: Die quantitative Erfassung des "Rheumafaktors" durch Präzipitation des Serums mit Gammaglobulin im "Grenzschichtrefraktiometer". Zschr. klin. Med. 156, 154 (1959)
- 72) Müller, W. u. Schupp, E.: Der Latex-Tropfentest (Rheumatoid-Arthritistest) und seine Bedeutung für die Diagnose und Differentialdiagnose chronisch rheumatischer Erkrankungen. Z. Rheumaforsch. 18, 378 (1959)
- 73) Müller, W., Wurm, K. u. Franz, G.: Das Vorkommen einer dem "Rheumafaktor" analogen Serumsubstanz bei Sarkoidose (Morbus Boeck). Beitr. Klin. Tuberk. 124, 462 (1961)
- 74) Müller-Eberhard, H.J.: Der Rheumafaktor. Dtsch. med. Wschr. 84, 719 (1959)
- 75) Müller-Eberhard, H.J.: Serum factors which interact with aggregated gamma globulin. Atti del X. Congr. della lega internat. contro il rheumatismo, Rom 3.-7.Sept.1961
- 76) Müller-Eberhard, H.J., Kunkel, H.G. and Franklin, E.C.: Two types of γ -globulin differing in carbohydrate content. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 93, 146 (1956)
- 77) Müller-Eberhard, H.J., Kunkel, H.G. u. Franklin, E.C.: Das Vorkommen eines ungewöhnlichen Gamma-Globulin-Komplexes im Serum Rheumakranker. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 63, 642 (1957)
- 78) Najjar, V.A. and Fisher, J.: Mechanism of antibody-antigen reaction. Science 122, 1272 (1955)
- 79) Najjar, V.A., Sidbury, J.B. and Fisher, J.: Further studies on the mechanism of antibody-antigen interaction. Biochem. biophys. Acta 26, 114 (1957)
- 80) Oker-Blom, N.: Serological studies in rheumatoid arthritis, I. A comparison between the agglutination of hemolytic streptococci and certain other bacteria by sera from patients with rheumatoid arthritis. Ann. Med. Exper. Biol. Fenn. 26, 77 (1948)
- 81) Oker-Blom, N.: Om agglutination av Staphylococcus aureus vid kroniks polyarthrit. Nod. Med. 41, 74 (1949)
- 82) Ouchterlony, Ö. u. Jenansson, E.: Nord. Med. 42, 1449 (1949); zit.: Müller-Eberhard, H.J.: (97)

- 83) Poltner, A. and Christian, C.L.: The presence of the "rheumatoid factor" in sera from patients with syphilis. *Arthritis Rheumatism* 2, 1 (1959)
- 84) Perlick, E.: Zur pathogenetischen Bedeutung der Serumkomplement-Aktivität bei Auto-Immunisationskrankheiten. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* 68, 572 (1962)
- 85) Pike, R.M., Sulkin, S.E. and Coggeshall, H.C.: Serological reactions in rheumatoid arthritis. II. Concerning the nature of the factor in rheumatoid arthritis serum responsible for increased agglutination of sensitized sheep erythrocytes. *J. Immun.* 63, 447 (1949)
- 86) Rheins, M.S., McCoy, F.W., Buehler, E.V. and Burrell, R.G.: Effects of animal sera and serum albumin on latex fixation test for rheumatoid arthritis. *Proc. Soc. exp. Biol.* 96, 67 (1957)
- 87) Rose, M., Ragan, C., Pearce, E. and Lipman, M.O.: Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 68, 1 (1948)
- 88) Scheidegger, J.J.: L'immuno-électrophorèse. *Sem. Hôp.* 32, 2119 (1956)
- 89) Schmid, F.R. and Slatis, M.: Clinical and serological abnormalities in the families of patients with rheumatoid arthritis. *Atti del X. Congr. della lega internat. contro il reumatismo*, Rom 2.-7.9.1961
- 90) Seifert, H.: Untersuchungen zum Nachweis des hämagglutinierenden Faktors, des Streptokokken agglutinierenden Faktors und zweier Latex agglutinierender Faktoren im Rheumatikerserum. *Z. Rheumaforsch.* 21, 217 (1962)
- 91) Shichikawa, K., Gamamoto, T. et Fujicka, M.: Sur la production expérimentale du facteur rhumatoïde. *Atti del. X. Congr. della lega internat. contro il reumatismo*, Rom 3.-7.9.1961
- 92) Singer, J.M. and Plotz, C.M.: The latex fixation test, I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Amer. J. Med.* 21, 888 (1956)
- 93) Singer, J.M. and Plotz, C.M.: Slide latex fixation test. A simple screening method for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *J. Amer. Med. Ann.* 168, 180 (1958)
- 94) Stein, L. and Wertheimer, E.: *Nature* 149, 528 (1942); zit.: Svartz, N. u. Schlossmann, K.: (136)
- 95) Svartz, N.: Serologische Diagnostik bei Kollagenkrankheiten. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* 65, 147 (1959)

- 96) Svartz, N.: The rheumatoid factor, its origin and nature. Acta med. Scand. 168, 235 (1960)
- 97) Svartz, N.: Der Rheumafaktor, seine Bedeutung und Eigenschaften. Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. 18, 1 (1962)
- 98) Svartz, N., Carlson, L.A., Schlossmann, K. and Ehrenberg, A.: Isolation of the rheumatoid factor. Acta med. Scand. 160, 87 (1958)
- 99) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: En ay serologisk reaktion vid kronisk polyarthrit. Nord. Med. Tskr. 42, 1390 (1949)
- 100) Svartz, N. and Schlossmann, K.: On substances agglutinating sheep erythrocytes obtained by fractionation of blood serum with carbon dioxide. Acta med. Scand. 145, 216 (1953)
- 101) Svartz, N. and Schlossmann, K.: Agglutination of sensitized sheep erythrocytes by cold precipitable serum substances in rheumatoid arthritis. Acta med. Scand. 146, 313 (1955)
- 102) Svartz, N. et Schlossmann, K.: Le facteur hémagglutinant dans le sang des malades souffrant d'arthrite rhumatoïde. Schweiz. med. Wschr. 83, 782 (1953)
- 103) Svartz, N. and Schlossmann, K.: A serum cold precipitable hemagglutinating factor in rheumatoid arthritis. Acta med. Scand. 149, 83 (1954)
- 104) Svartz, N. and Schlossmann, K.: Cold precipitable hemagglutinating factor in serum from patients with rheumatoid arthritis. Ann. rheum. Dis. 14, 191 (1955)
- 105) Taranta, A., Weiss, H.S. and Franklin, E.C.: Precipitating factor for aggregated γ -Globulins in normal human sera. Nature 189, 239 (1961)
- 106) Tuch, E.: Allergie und Rheumatismus. Acta allerg. 14, 203 (1959)
- 107) Vaughan, J.H.: Behavior of the rheumatoid arthritis agglutinating factor with immun precipitates. J. Immunol. 77, 181 (1956)
- 108) Vaughan, J.H.: Serum responses in rheumatoid arthritis. Amer. J. Med. 26, 596 (1959)
- 109) Vaughn, P.P., Broome, B.L. and Howel, D.S.: Improved methods for detection of F II latex agglutinating factors in early rheumatoid arthritis. Arthritis Rheumatism 2, 362 (1959)
- 110) Vorlaender, K.O.: Auto-Antikörper und Pathogenität. Dtsch. med. Wschr. 87, 887 (1962)

- 11) Waaler, E.: On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. Acta path. microbiol. Scand. 17, 172 (1940)
- 12) Wager, O.: On the factor producing agglutination of sensitized red cells and its relation to the agglutination of hemolytic streptococci in rheumatoid arthritis serum. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 28, Suppl. 8, 1 (1950)
- 13) Waller, M.V. and Vaughan, J.H.: Use of anti-Rh sera for demonstrating agglutination activating factor in rheumatoid arthritis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 198 (1956)
- 14) Wimblad, S.: Studies on different laboratory tests for the rheumatoid arthritis serum factor. I. Evaluation of different agglutination methods for whole serum, cold precipitable and euglobulin serum fractions. Acta path. microbiol. Scand. 49, 499 (1960)
- 15) Wolfson, W.Q., Cohn, C., Calvary, E. and Ichiba, M.: Amer. J. Med. 20, 500 (1956); zit.: Willens, D. and Pishman, A.: Rose-Waaler-Test using a rapidly prepared serum fraction. Ann. Rheum. Dis. 17, 383 (1958)
- 16) Ziff, M.: The agglutination reaction in rheumatoid arthritis. J. chron. Dis. 5, 644 (1957)
- 17) Ziff, M.: Genetics, hypersensitivity and the connective tissue diseases. Amer. J. Med. 30, 1 (1961)
- 18) Ziff, M., Brown, P., LeSpalluto, J., Badin, J. and McEwen, C.: Agglutination and inhibition by serum Globulin in the sensitized sheep cell agglutination reaction in rheumatoid arthritis. Amer. J. Med. 20, 500 (1956)
- 19) Ziff, M., Schmid, F.R., Lewis, A. and Tanner, M.: Familial occurrence of the rheumatoid factor. Arthritis Rheumatism 1, 392 (1958)

Herrn Professor Dr. W. Seitz danke ich für die Überlassung des Themas; Herrn Dr. H. Mathies danke ich für die Anregung und Anleitung bei der Durchführung der Versuche und Abfassung der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 3. Februar 1937 wurde ich, Elisabeth Batstone geb. Hörhager, in Nürnberg als Tochter des Kaufmanns Ludwig Hörhager und seiner Ehefrau Elisabeth geboren.

Von 1944 - 1948 besuchte ich die Volksschule in Pullach bei München, von 1948 - 1954 die Oberrealschule für Mädchen. Da ich beabsichtigte, Fürsorgerin zu werden, war ich von 1954 - 1956 als Praktikantin an der Hauner'schen Universitäts-Kinderklinik, München, in einem Kinderheim und in England im Haushalt tätig. 1958 trat ich in die 9. Klasse des Mädchen-realgymnasiums am Anger in München ein und unterzog mich 1959 der Reifeprüfung.

Im Winter 1959/1960 begann ich in München mit dem Medizin-studium und legte im April 1962 das Physikum ab. Ein Semester studierte ich in Hamburg und anschließend wieder in München. Das Staatsexamen vollendete ich am 28. Juli 1965.

